

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

⑪ 公開特許公報 (A) 昭64-2585

⑤Int.Cl.¹
 C 12 N 15/00
 1/20
 //C 12 N 15/00
 C 12 R 1:465)
 (C 12 N 1/20
 C 12 R 1:465)

識別記号 庁内整理番号
 A-8412-4B
 G-8515-4B

⑩公開 昭和64年(1989)1月6日

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全21頁)

⑪発明の名称 テトクロームP-450遺伝子を含有するDNA

⑪特願 昭63-48927

⑪出願 昭63(1988)3月2日

優先権主張 ⑪昭62(1987)3月2日 ⑪日本(JP) ⑪特願 昭62-45127

⑪発明者 馬目 太一 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

⑪発明者 保志野 恵美子 東京都品川区広町1丁目2番58号 三共株式会社内

⑪出願人 三共株式会社 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

⑪代理人 弁理士 榎出 庄治

明細書

地図を有するDNA断片。

1. 発明の名称

テトクロームP-450遺伝子を含有するDNA

2. 特許請求の範囲

- 放線菌のテトクロームP-450遺伝子を含み水酸化活性を宿主に付与しうるDNA断片。
- P-450遺伝子を含み水酸化活性を宿主に付与しうるDNAが、ML-236Bナトリウム塩(ML-236BNa⁻)をCS-514へ変換する能力を有する放線菌の染色体K由来する約7.1-kbのDNA断片であって下図で表わされる制限酵素切断地図を有する特許請求の範囲第1項記載のDNA。

(Bgl II/Mbo I)

(Bgl II/Mbo I)

Sp	Bc	E	X	P	Sp	M
0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	1.0	0.2

4. DNAがプラスミドpHY01, pHY02またはpHY021である特許請求の範囲第1項記載のDNA。

5. 特許請求の範囲第3項記載のDNA断片を含むプラスミドpHY023であるDNA。

6. DNAとしてプラスミドpHY01, pHY02, pHY021またはpHY023を含有する微生物。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明はストレプトミセス属に存在し、水酸化酵素活性を有するテトクロームP-450の生成に関する遺伝子部分を有するDNAの単離およびその利用に関する。さらに詳しくはストレプトミ

Sp	Bc	E	X	P	Sp	M	M	P	K	S _a
0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	1.0	0.7	2.0	0.5	0.8	0.2

- P-450遺伝子を含む領域が約2.9-kbのDNA断片であって下図で表わされる制限酵素切断

セス属に存在し ML-236Bナトリウム（以下、「ML-236B Na」という）を $\delta\beta$ -ヒドロキシ-ML-236Bナトリウム（以下、「CS-514」という）へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450を包含する蛋白質の生成に関し、制限酵素Mbo I の部分消化によって生成され、約7.1 kbからなるDNA断片中に存在し水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子を含有

することを特徴とするDNAに関する。

従来の技術

微生物を用いるDNA組み換え実験は特に大腸菌を中心として枯草菌、酵母において発展してきた。なかでも大腸菌のDNA組み換え実験の発展はめざましく、種々の遺伝子の解析のみならずある種の有用ペプチドの工業生産にまで応用されるに至っている。一方、放線菌は抗生素質や生理活性物質などの二次代謝産物の生産に関して多種多様な能力を有すること、あるいは微生物変換において種々機能を発揮することから、医薬工業の分野では古くから重視されてきている。にもかかわらず放線菌の育種の手法は限られており、この限られた手法の中で生産性向上などに成果をあげてきた。このような状況のもとで放線菌の育種改良研究の一つの手法として、DNA組み換え実験系の確立が望まれ、その手法を用いての生産性向上や新規物質の生産が期待されるようになつてきた。現在、放線菌の特定菌種 (*S. coelicolor* A3(2))

*S. lividans*など)では宿主・ベクター系が確立され種々の放線菌遺伝子がクローニングされている。それらは例えば抗生素質の生産に関する遺伝子としてのアクチノロジン生合成遺伝子 (Nature, 303, 482 (1983)), エリスロマイシン生合成遺伝子 (Bio technology, 2, 808 (1984))などである。アクチノロジン生合成遺伝子を同類の抗生素質であるメデルマイシンの生産菌ストレプトミセス・エス・ピーに導入すると新規抗生素質のメデルロジンが生産されたとの報告がある (Antimicrob. Agents Chemother., 28, 13 (1984))。また放線菌の酵素遺伝子もエンドグリコシダーゼII遺伝子 (J. Biol. Chem., 256, 10840 (1981))をはじめとしていくつかの報告がある。

発明が解決しようとする問題点

上述のごとく放線菌の遺伝子のクローニングに関する報告は増えつつあるものの、抗生素質生産、生理活性物質生産、微生物変換能など放線菌の能力の多様性を考慮するとこれらの研究

ははじまつたばかりである。特に放線菌を用いての微生物変換に関する酵素の遺伝子については、工業上の重要性にも拘わらずいまだにクローニングされた例がない。従つて、放線菌の組み換えDNA技法をこのような放線菌の育種改良に用いることが望まれている。

問題点を解決する手段

本発明者らは、微生物変換に用いられるストレプトミセスの特定の酵素の生産に係る遺伝子を含むDNAを提供すべく研究した。その結果、ML-236B Naの $\delta\beta$ 位を水酸化しCS-514へと変換させ得る水酸化酵素遺伝子を含むDNAをストレプトミセス属に属する菌株から分離することに成功した。ML-236B NaからCS-514への水酸化活性を欠失しているか、または活性の低い例えはストレプトミセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) IC、該DNAを組み込んだプラスミドを導入することにより、保る遺伝子が発現し、ML-236B NaからCS-514への変換が可能であることから該DNA

を含有する組み換えプラスミドを工業生産に用いられる例えばストレプトミセス・カルボフィラスに導入することにより、その遺伝子の増幅効果によって、変換効率の良い株または単位基質 (ML-236B Na)あたりの変換時間の短い株の造成が期待できることを見出し、本発明を完成した。

本発明によれば、ML-236B Na の 8 β 位を水酸化して CS-514 へ変換しうる水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 遺伝子に関し、該遺伝子の DNA 断片を含有する組み換えプラスミドが提供される。

本発明のチトクローム P-450 遺伝子を含む DNA 断片は、ML-236B Na を基質とし、CS-514 へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 の遺伝子を含むものであれば、それが他の種類の基質をも水酸化するものであつてもよい。また、チトクローム P-450 遺伝子を含む DNA 断片の起源としては、特にその種類を問わず、ML-236B Na の

確認でき、宿主域の広いプラスミドがよい。

従つて、そのようなプラスミドとしてはチオストレブトン耐性が付与され、且つ本来 pIJ 102 のメラニン産生遺伝子を発現できない放線菌においてもメラニン産生遺伝子を発現できるように設計され、広い宿主で用いることの可能な例えばプラスミド pMEL18, pMEL18, pMEL25 (特願昭61-183318号) が好適である。

本発明で提供するチトクローム P-450 遺伝子を含む DNA はベクタープラスミドにチトクローム P-450 遺伝子を含む DNA を含有したものであればよく、例えば本発明者の命名するところの後述するプラスミド pHY01 や宿主菌の中でプラスミド pHY01 が組み換えられた結果生じたプラスミド pHY02 またはそれから誘導されるプラスミド pHY021 を挙げることが出来る。

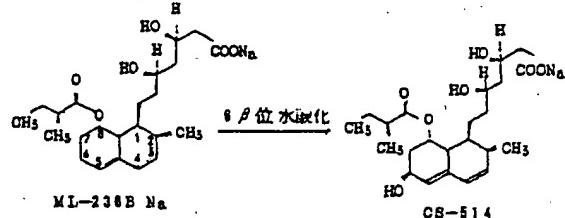
ここに ML-236B Na の 8 β 位を水酸化し CS-514 の生成に與する水酸化酵素活性

8 β 位を水酸化し CS-514 を生成する能力を有する放線菌の染色体 DNA に由来するものが好適に用いられる。そのようなものとしては例えばストレプトミセス・フラボビレンス (*Streptomyces flavovirens*)などを挙げることが出来る。

他方、ベクタープラスミドとしては放線菌内にあつて自律増殖可能であり、かつ宿主細胞の分裂に係して安定に娘細胞に受け継がれていく安定保持性に優れたものであればよく、使用する宿主によつて自由に選ぶことが出来る。ベクタープラスミドの具体的なものとしては例えば公知の pIJ 702 (Katz et al., J. Gen. Microbiol., 128, 2103 (1983)) 等を挙げることが出来る。

しかしながら、ベクタープラスミドは本発明の DNA を含む組み換えプラスミドを含有する形質転換体のスクリーニングに適した特定の抗生素耐性を付与する遺伝子を有し、且つ挿入失活によつて組み換えプラスミドであることか

を有するチトクローム P-450 遺伝子は下図



で示されるように ML-236B Na の 8 β 位の水酸化反応を触媒する水酸化酵素産生に與する DNA をいう。

本発明のチトクローム P-450 遺伝子を含む DNA を含有する組み換えプラスミドの調製はそれ自体公知の方法で行なうことが出来る (例えば D.A. Hopwood, "Genetic manipulation of Streptomyces", a Laboratory Manual, The John Innes Foundation, 1985).

組み換えプラスミドの調製方法

(1) ベクタープラスミド

ベクターブラスミドとしては上述のように放線菌で安定に複製増殖を維持出来るものであれば、何でも用いることが出来るが、それから使用目的に応じて選導されるものも含まれる。例えばストレプトミセス・リビダンス BANK 88182 [微研条第1141号 (FERM BP-1141)]を用いてそれ自体公知の方法(例えばD.A Hopwoodら, "Genetic Manipulation of Streptomyces", A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, 1985)により採取出来るプラスミド pIJ7102 をベクターとして用いることが出来る。また、プラスミド pIJ7102 のメラニン産生遺伝子を発現出来ない放線菌宿主でも使用出来るように調製されたプラスミド pMEL18, pMEL18, pMEL28 も同様に用いることが出来る。これらのプラスミドは選別標識(マーク)としてチオストレプトン耐性(以下、「Tnio^r」という)とメラニン産生(以下、「Mol⁺」という)が付与されており、 Tnio^r, Mol⁺ を示す形質転換株を選別すること

スミドによる宿主菌の形質転換を行なつた後、例えば Tnio^r, Mol⁺ を示す組み換えプラスミド含有形質転換体を選別する。次いで選別された形質転換体から目的の形質を発現する形質転換体を選別することにより行なうことが出来る。前述のプラスミド pMEL18 をベクターとして使用する場合を1例として挙げれば、次の通りである。即ち、染色体DNAを制限酵素 MboI により 2~20 kb のDNA断片となるよう部分分解(例えば T.Maniatis ら, "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 282頁, 1982)し、得られる該DNA断片を、 Bgl I により切断開環した pMEL18 と混合し、さらに T4 DNAリガーゼで連結処理する。これによつて、染色体DNAの断片が導入された目的の組み換えプラスミドを含有する連結混合物を得る。連結混合物から目的の組み換えプラスミドを選別するには、該混合物を ML-236B Na₂ の S' 位を水酸化し CS-514 へ変換する能力を本来持たないかもしくは極めて低い能力し

とにより組み換えプラスミドの開裂に有利に用いることが出来る。

(2) 水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 遺伝子を含むDNAのクローニング

上述の ML-236B Na₂ の S' 位を水酸化し CS-514 に変換する水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 遺伝子を含む放線菌(例えばストレプトミセス・フラボビレンスなど)の菌体より染色体DNAを公知の方法、例えば Marmur の方法(J.Mol.Biol., 1, 208 (1961))で抽出する。抽出された染色体DNAを適当な制限酵素により切断すれば、目的のチトクローム P-450 遺伝子を含むDNA断片が他のDNA断片と共に得られる。このようにして得られるDNA断片の混合物から目的の遺伝子を含むDNAを含有する組み換えプラスミドを調製するには、まずチトクローム P-450 遺伝子を含むDNA断片の末端と結合し得るように処理されたベクタープラスミドへ該DNA断片を組み込む。次に生成された各種の組み換えプラ

スミドによる宿主菌のプロトプラストに導入し、寒天平板上に塗抹する。次いで培養した寒天平板上、チオペプチドを加えた軟寒天培地を重層する。重層後、該寒天平板を培養すると Tnio^r を示す形質転換株が生育していく。このなかで組み換えプラスミドを有する形質転換株はメラニンを産生しないので容易に判別可能である。次いで選別されたメラニンを産生しない形質転換株は ML-236B Na₂ を添加した寒天平板上に移植して培養し、コロニーを十分に生育させる。このコロニーをトロツカーで打抜き寒天ブラングを作製する。このようにして作製した寒天ブラング 10 個を 1 つの集団としてマイクロチューブに入れ、エタノール水溶液を加えよく搅拌、抽出した後、遠心分離しその上清を高速液体クロマトグラフィー(以下、「HPLC」という)に付す。次いで CS-514 に由来するピークの存在の有無を判別するという一次スクリーニングに供した。

二次スクリーニングは一次スクリーニングで

CS-514 に由来するピークの存在が認められた集団に含まれるコロニーから夫々をオペブテンを含む培地に接種し振盪培養する。次いで ML-238B Na₂ を添加しさらに振盪培養を継続した後、その培養液をマイクロチューブに採取し、速心分離し上清を採取する。採取した上清を HPLC に付し ML-238B Na₂ の S 位を水酸化し CS-514 へ変換しているクローンを選別する。このように CS-514 を生成するクローンが本発明の水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 遺伝子を含む DNA を含有する組み換えプラスミドを保持する。従つてこれを前述のプラスミド抽出法によつて抽出すればベクタープラスミドに ML-238B Na₂ の S 位を水酸化し CS-514 へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 遺伝子を含む DNA が含有された組み換えプラスミドを取得出来る。このようにして得られた組み換えプラスミドとして例えば具体的にはプラスミド pHY01 またはプラスミド pHY02 を挙げることが出来

を宿主としてプラスミド pHY01 を用いて再形質転換すると得られる再形質転換株はすべて Thio^r となると共に水酸化活性の復帰および CO 差スペクトルによる 450 nm 付近の吸収・極大の復帰が認められることおよびこの再形質転換株からプラスミド pHY01 が分離できることから確認される。しかしながら、このプラスミド pHY01 は第 2 図から明らかの如く、小型化するには不都合である。小型化の研究には以下に述べるプラスミド pHY02 を用いた。

(II) プラスミド pHY02 の存在確認とプラスミド pHY02 の誘導

プラスミド pHY01 の形質転換によつて、ML-238B Na₂ を CS-514 へ変換する能力を示す形質転換株の 1 株から分離された組み換えプラスミドは、プラスミド pHY01 以外にはほぼ同じ大きさのプラスミド pHY02 が存在していることが判明した。即ち、プラスミド pHY01 は Sac I 消化によつて約 1.0 kb および約 0.8 kb の DNA 断片を生成することがわ

る

(3) 組み換えプラスミドの具体的説明

上述の方法によつて得られる組み換えプラスミド pHY01 およびプラスミド pHY02 (実施例並びに第 2 図および第 3 図参照)、更にプラスミド pHY02 から誘導されるプラスミド pHY02-1 (第 4 図参照) について、具体的に述べる。

(I) プラスミド pHY01 による水酸化酵素活性の確認

プラスミド pHY01 の含有する挿入 DNA 断片が、ML-238B Na₂ の S 位を水酸化して CS-514 へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 遺伝子を含むことは次のことから理解される。即ちプラスミド pHY01 を含有する組み換え株からのプラスミドを除去することによつて生ずるプラスミド除去株はオペブテン感受性となり、同時に水酸化活性の消失と CO 差スペクトルによる 450 nm 付近の吸収極大の消失を伴うことから理解される。さらに該プラスミド除去株

かつているが (第 2 図参照)、該プラスミド混合物は Sac I は消化によつてプラスミド pHY01 に由来する約 1.0 kb および約 0.8 kb の DNA 断片の他にプラスミド pHY02 に由来する約 1.21 kb および約 2.4 kb の DNA 断片を生成する。そこで該プラスミド混合物を用いてストレプトミセス・リビダンスを形質転換し、Sac I 消化によつて約 1.21 kb と約 2.4 kb の DNA 断片を生ずるプラスミドのみを含む形質転換株を分離することによつてプラスミド pHY02 を単独に含む形質転換株が得られる。この形質転換株は ML-238B Na₂ から CS-514 へ変換する能力を有していることからプラスミド pHY02 もプラスミド pHY01 と同様に ML-238B Na₂ の S 位を水酸化して CS-514 へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクローム P-450 遺伝子を含む挿入 DNA 断片を持つてゐることになる。プラスミド pHY02 は該プラスミドを単独に含む形質転換株から調製することが出来る。

第3図に示すプラスミドpHYO2の制限酵素切断地図を作成することにより、該プラスミドのベクター部分に存在するSph Iサイトを含む約2.0 kbが欠失していること、水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子を含む約1.0 kbの挿入DNA断片において宿主細胞内において、少なくともSac IからSph Iサイトまでの約6.7 kbを含む約2.1 kbのDNA断片が組み換えを受け、pHYO2の挿入DNA断片における当該部分と相同域が逆向きに配位されたものであることが理解される。このように少なくとも約6.7 kbのDNA断片が逆向きに配位されたにも拘わらずML-236BN_aからCS-514への変換を受けることは、ML-236BN_aをCS-514へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子が、少なくともSac IからSph Iサイトまでの約6.7 kbを含む約2.1 kbのDNA断片内に位置していること、および該チトクロームP-450遺伝子のアロモー

タクローンについて前述のプラスミド抽出法によってプラスミドを抽出取得出来る。かくして得られる具体的なものとしては第4図に示す約13.1 kbから成りSac I切断サイトが1ヶ所となったプラスミドpHYO 21を挙げることが出来る。第4図はプラスミドpHYO 21の制限酵素切断地図を示すが、該プラスミドはプラスミドpHYO2におけるSac I消化によって生ずる約2.4 kbのDNA断片に相当する領域が除去されたこと以外はプラスミドpHYO2と同一であることが示される。

図 チトクロームP-450遺伝子局在領域の決定

プラスミドpHYO 21の挿入DNA断片約7.1 kb内にML-236BN_aからCS-514へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450が位置していることはすでに述べた。次に、この約7.1 kb挿入DNA断片内のどの領域にチトクロームP-450遺伝子が局在するかを検討した。その検討方法は挿入DNA断片内にある制限酵素部位を利用して行なった。即ち、pHYO 21をSph Iで完全に消化した後、アガロース・ゲル電気泳動すると約1 L.6 kbと約

タ領域も含有されていることを示唆する。

前述のごとくプラスミドpHYO2において、Sac IからSph Iサイトまでの約6.7 kbを含む約2.1 kbのDNA断片内に水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子が含まれているということは、Sac I消化によつて生ずる約2.4 kbのDNA断片は水酸化酵素活性の発現には不要であることを示す。従つてこの約2.4 kbのDNA断片を除去することによつてプラスミドの小型化が可能であることは容易に理解される。まずプラスミドpHYO 2をSac Iで消化し、約13.1 kbと約2.4 kbのDNA断片を得、次いで加熱処理したのちT₄DNAリガーゼで連結し連結混合物を得る。次いでストレプトミセス・リビダンスのプロトプラストに導入し、前述の方法によつて形質転換株を得る。さらにこれらの形質転換株は前述の二次スクリーニングと同じ方法によつて培養されHPLCにてCS-514を生成するクローンを選別する。次いで選別され

1.8 kbのDNA断片に切断されていることがわかる。この約1 L.6 kb DNA断片を含むゲルを切出し、電気泳動法によって該DNA断片を得、これをT₄DNAリガーゼで連結処理した後、ストレプトミセス・リビダンスのプロトプラストに導入する。

かくして得られた形質転換株はプラスミドpHYO 21の約7.1 kb挿入DNA断片から約1.5 kbのSph I断片を欠失した約5.6 kbの挿入DNA断片を含む約1 L.6 kbのプラスミドpHYO 22を含有している。またプラスミドpHYO 21をMlu Iで完全に消化した試料をアガロース・ゲル電気泳動すると約8.6 kb、約3.6 kb（ベクターDNA断片の約0.3 kbを含む）および約0.9 kbのDNA断片に切断されていることがわかる。このなかの約8.6 kbのDNA断片を含むゲルを切出し、電気泳動法によって該DNA断片を得、これをT₄DNAリガーゼで連結処理した後、ストレプトミセス・リビダンスのプロトプラストに導入する。かくして得られた形質転換株はpHYO 21の約7.1 kbの挿入DNA断片からMlu I消化によって生ずる約4.2 kbのDNA断片を欠失

した約2.9 kbの挿入DNA断片を含む約8.6 kbのプラスミドpHYO 23を含有している。

次に、これらのプラスミドpHYO 22およびプラスミドpHYO 23を含有する形質転換株について前述の二次スクリーニングと同じ方法によって培養されHPLCにてCS-514の生成量を調べると同時に、菌体を超音波破碎したのち遠心分離して得られる無細胞抽出液についてOhmuraらの方法(J. Biol. Chem., 239, 2370, 1964)に従い、還元型CO差スペクトルによりチトクロームP-450の有無を判定した。

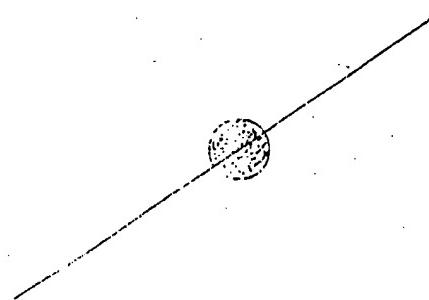
第7図はその結果を示すがチトクロームP-450遺伝子はpHYO 23の挿入DNA断片約2.9 kb内に局在することが示される。また、ML-236B N₂からCS-514への十分な変換活性を宿主ストレプトミセス・リビデンスに与えるためには約7.1 kbの全域が必要であることが示される。

なお、本発明において使用される放線菌の詳細な説明は次の通りである。

して用いた臨界点乾燥を行った。乾燥サンプルにはイオンコーナーIB-3型を用い、金の膜の厚さが約200Åになる様に蒸着した。観察は走査電子顕微鏡MSM-4型(日立明石)によった。この時の加速電圧は25kVである。

表1 形態的特徴 (28℃, 10日間観察)

胞子柄形態	直状～曲状
胞子表面	平滑
胞子連鎖数	50個以上
気菌子分枝	単純分枝
特殊器官	なし



1. ストレプトミセス・フラボビレンス SANK 63684

(微生物研究第9170号)

本発明に用いたML-236B N₂からCS-514への変換能を有するストレプトミセス・フラボビレンス SANK 63684の形態的諸性質及び生理的諸性質は次の通りである。なお各種寒天培地の調製、種培養、本培養及び結果の観察はISP基準、応用微生物工業審査基準、ワックスマンの勧告などに従った。各種培地上の生育色調は「色の基準」(日本色彩研究所版)に従った。

1) 形態学的特徴

形態学的特徴は光学顕微鏡観察のほか、下記の要領で調製したサンプルを用いた電子顕微鏡観察も行った。

菌株の固定には2%オスミウム酸を用い、室温下約10時間蒸気固定した。固定サンプルを寒天培地のまま、50, 70, 80, 90, 95, 100%の各濃度のエタノールで15分間脱水し、媒介液酢酸イソアミルで置換した。乾燥は、臨界点乾燥装置HCP-1を使用し、液体炭酸を移行液と

2. 各種培地上の培養性状

表2 (28℃, 14日間観察)

イースト・麦芽寒天 (ISP 2)	G	非常に良好 薄オリーブ(5-7-11)
	R	オリーブ灰～灰(2-7-11～N-7)
	SP	なし
オートミール寒天 (ISP 3)	G	非常に良好 明るいオリーブ(6-5-11)
	AM	豊富 オリーブ灰～灰(2-7-11～N-7)
	R	オリーブ(4-4-11)
スター・無機塩 寒天 (ISP 4)	SP	なし
	G	良好 明るいオリーブ灰(4-8-11)
	AM	豊富 オリーブ灰～灰(2-7-11～N-7)
グリセリン・ アスパラギン寒天 (ISP 5)	R	明るいオリーブ灰(4-6-11)
	SP	なし
	G	あまり良くない オリーブ灰(8-8-11)
AM	やや少い 灰(N-7)	
	R	薄オリーブ(8-7-11)
	SP	なし

ペプトン・イースト エキス・酵母天 (ISP 6)	G 良好 明るい茶味灰(1-8-10) AM / 灰味白 (N-9) R 薄黄味灰 (6-7-9) SP なし
チロシン酵天 (ISP 7)	G 良好 明るいオリーブ(6-5-11) AM / 黄味灰~灰(2-9-12~N-7) R 明るいオリーブ(6-5-11) SP なし
ショクロース・ 硝酸塩酵天	G あまり良くない 色なし AM やや少し 明るい茶味灰(1-7-6) R 明るいオリーブ灰(4-7-11) SP なし
グルコース・ アスペラギン酵天	G あまり良くない 薄黄(6-9-11) AM やや少し 黄味灰~灰(2-9-11~N-7) R 薄黄~オリーブ灰(6-9-11~3-7-12) SP なし
栄養酵天 (Difco)	G あまり良くない 明るいオリーブ灰(2-8-11) AM 良好 灰味白 (N-8) R オリーブ灰 (3-7-10) SP なし

G:生育 AM:気菌糸 R:裏面 SP:可溶性色素

3. 生理的性質

表 3

スターの加水分解	陽 性
セラチンの液化	/
ミルクの凝固 26°C	陰 性
37°C	陽 性
ミルクのペプトン化 26°C	/
37°C	/
硝酸塩還元	/
メラニン様色素生産性 (培地1)	陰 性
(培地2)	/
(培地3)	/
生育温度範囲 (培地4)	15~40°C
食塩耐性 (+)	7%

- * 培地1: トリプトン・イーストエキスプロス (ISP 1)
 2: ペプトン・イーストエキス・酵母天 (ISP 6)
 3: チロシン酵天 (ISP 7)
 4: イースト・麦芽エキス酵天 (ISP 2)

4. 炭素源の変化性

表 4

D-グルコース	+	D-マンニトール	+
L-アラビノース	+	D-フルクトース	+
D-キシロース	+	L-ラムノース	+
イノシトール	-	ショクロース	-
ラフィノース	-		

+: 良く変化する +: 変化する -: 変化しない

5. 細胞壁化学組成

Becker の方法 (Appl. Microbiol. 12, 236, 1965) に依る分析の結果、細胞壁主要構成物質として LL-ジアミノピメリレン酸およびグリシンを検出した。細胞壁型は I 型である。

以上の結果を要約すると、SANK 63684 は直状~曲状の胞子柄を示し、その先端に 50 個以上の胞子連鎖を形成する。胞子表面は平滑である。基生菌糸は薄オリーブ~オリーブ灰~明るい茶味灰の生育をし、灰味白~オリーブ灰~灰色の気菌糸を

着生する。気菌糸は粉状であり培養後期に纏糸化 (hygroscopic) に伴う黒い斑点が見られる場合もある。また、可溶性色素およびメラニン様色素は産生しない。細胞壁型は LL-DAP とグリシンを含む I 型である。

これらの諸性状から、SANK 63684 はストレプトミセス属に属することは明らかである。既知ストレプトミセス属の中でも特に近縁の種としてストレプトミセス・フラガビレンスが挙げられる。そこで、ストレプトミセス・フラガビレンス ISP 5062 株と本菌株の同時比較培養を行った。その結果、両菌株間には形態的諸性状および生理的諸性質において、ほとんど差異は認められなかった。従って、SANK 63684 はストレプトミセス・フラガビレンスと同一種と考えられ、本菌株をストレプトミセス・フラガビレンス SANK 63684 と同定した。

2. ストレプトミセス・リビダンス SANK 68182

[微生物研究会第 114 号 (FERM BP-1141)]
 E. Kato によって構築されたプラスミド pJ702 を保持するストレプトミセス・リビダンス 3131

である (J. Gen. Microbiol. 129, 2703 ~ 2714, 1983)。

3. ストレプトミセス・リビダンス SANK 63086
(微研菌寄第9169号)

ストレプトミセス・リビダンス TK 21 である。本菌株は "Genetic Manipulation of Streptomyces", A Laboratory Manual, The John Innes Foundation, 1985 に記載されており、放線菌の宿主として世界中で用いられている。

4. ストレプトミセス・リビダンス SANK 60587
(微研菌寄第9168号)

本発明者らによって構築されたプラスミド pMEL 18 (特開昭62-122585, J. Antibiotics, 40, 1440 ~ 1447, 1987) を保持するストレプトミセス・リビダンス TK 21 株である。

5. ストレプトミセス・ジューモンジネンシス [16]-8-
SANK 61185 [微研菌寄第1140号(FERM
BP-1140)]

本菌株の形態学的諸性質及び生理的諸性質については特開昭62-122585号公報において詳細

坂
GGC⁷ 培地 100 μl の入つた 100 ml 液密ロフ (ラスコに 5 ㎖ 量接種し 28 ℃ で 24 時間往復振盪培養した。この培養液から低速遠心で菌糸体を得、この菌糸体から Marmur の方法 (J. Mol. Biol., 1, 208, (1961)) に準じて全 DNA を抽出、精製し、DNA 溶解用緩衝液 (10 mM Tris (pH 7.5), 10 mM NaCl, 1 mM EDTA) で透析して供与体 DNA とした。

このようにして得られた供与体 DNA 5 μg を、1 μl の Mbo I を用いて 37 ℃ で反応させ、3 ~ 20 kb の DNA 断片になるよう部分分解した。この反応液は 70 ℃ で 10 分間処理することによつて Mbo I を加熱失活させた。次いで 2.5 倍容量の -20 ℃ のエタノールを加え -70 ℃ で 30 分間放置後、15,000 rpm で 3 分間遠心して DNA を沈殿させた。

他方、ベスター・プラスミド pMEL 18 (参考例参照。本プラスミドはストレプトミセス・リビダンス SANK 60587 (微研菌寄第9168号) から D.A.Hopwood ら "Genetic Manipulation of

に述べている。

実施例 1. 組み換えプラスミドの調製法と形質転換

ストレプトミセス・フラボビレンス SANK 63684 (微研菌寄第9170号) を GGC⁷ 液体培地 (0.4 % グリセロール, 0.1 % グリシン, 0.4 % カゼミノ酸, 0.1 % 硫酸マグネシウム, 0.01 % 塩化カルシウム, 0.1 % 酵母エキス, 微量金属塩溶液 4 ml/l) に接種し、28 ℃ で 3 日間振盪培養した。これを種とし、新鮮な

Streptomyces, A Laboratory Manual, The John Innes Foundation (1985) に記載の方法によつて採取される。) の 1 μl を 5 μl の Bgl II によつて 37 ℃, 2 時間反応させ完全に切断した。この Bgl II で切断された pMEL 18 は 70 ℃ で 10 分間加熱して Bgl II を失活させた後、前述と同じくエタノール沈殿させた。

以上のようにして調製した Mbo I で部分分解した供与体 DNA と Bgl II で完全切断した pMEL 18 とを、35 μl の蒸留水に溶解した。これに 10 倍濃度のリガーゼ反応用緩衝液 (8.80 mM Tris-HCl, 8.8 mM MgCl₂, pH 7.8) 5 μl, 50 mM のジチオスリトリール 5 μl および 1.0 mM の ATP 5 μl を加え全量を 50 μl とし、これに T4 DNA リガーゼ 5 μl を加え、14 ℃ で 16 時間反応させた。このようにして pMEL 18 とストレプトミセス・フラボビレンス SANK 63684 染色体 DNA との組み換えプラスミド混合物を調製した。この組み換えプラスミド混合物から目的の組み換えプラスミドを選別するため、ML-236B

N_a を CG-514 へ変換する能力を本来持たないかもしくは極めて低い能力しか持たない放銀菌であるストレプトミセス・リビダンス SANK 63088 (微研菌庫 9169 号) のプロトプラストに該組み換えプラスミド混合物を導入した。即ち、3.4% 蔗糖を含有する DGC^T 培地で 28℃ で 3 日間培養したストレプトミセス・リビダンス SANK 63088 の菌糸体を含む培養液を種とし、新鮮な 3.4% 蔗糖を含有する DGC^T 培地 100 ml (500 ml 容坂口フラスコ) に 5% 多量接種し 28℃ で 24 時間往復振盪培養した。該培養液から低速遠心で菌糸体のペレットを得、これを 20 μl の P 培地 (220 mM 蔗糖、 25 mM TES 緩衝液、 70 mM NaCl、 10 mM MgCl₂ · 8H₂O、 20 mM CaCl₂ · 2H₂O) に懸濁し洗浄した。次いで遠心し得られた菌糸体を 20 μl の P 培地に懸濁した。この菌糸体懸濁液に 40 μg/ml 濃度のリゾチーム溶液 1 μl を加え、 28℃ で 1 時間加温するとストレプトミセス・リビダンス SANK 63088 株のプロトプラストが生成した。この

R₂MP 培地 (蔗糖 1.20 g, K₂SO₄ 0.25 g, K₂HPO₄ 0.05 g, MgCl₂ · 8H₂O 1.012 g, CaCl₂ · 2H₂O 0.85 g, グルコース 4 g, カザミノ酸 0.1 g, L-プロリン 3 g, DL-ノルロイシン 0.05 g, チロシン 0.5 g, 酵母エキス 2 g, 麦芽エキス 0.5 g, 250 mM TES 緩衝液 (pH 7.2) 100 ml, 微量金属塩溶液 2 μl, 寒天 2.0 g を加え 1000 ml とする) はメラニン様色素の產生を強調するために調製した培地である。 R₂MP 寒天平板上に塗抹後、 28℃ で 20 時間培養した R₂MP 寒天平板上に最終濃度 50 μg/ml となるようにチオベブチンを加えた軟寒天 R₃ 培地 (蔗糖 1.20 g, K₂HPO₄ 0.2 g, MgCl₂ · 8H₂O 0.1 g, CaCl₂ · 2H₂O 2.2 g, 250 mM TES 緩衝液 (pH 7.2) 100 ml, グルコース 1.0 g, 酵母エキス 4 g, ポリベブトン 4 g, KC_l 0.5 g, 寒天 5 g を加え 1000 ml とする) を 3 ml 重層した。重層後、該寒天平板を 28℃ で培養を繼續するとチオベブチンに耐性を示す形質転換株の生育がみられた。これらのチオベブチン耐性

プロトプラストと未溶解の菌糸体の混合物をグラスフィルター (303) にて自然ろ過しプロトプラストを多量に含有したプロトプラスト液を得た。これを低速遠心しペレットを得、これを再び P 培地に懸濁した。この操作を 3 回繰返し十分洗浄することにより所望のプロトプラスト数を含有するプロトプラスト液を調製した。

得られたプロトプラスト液を遠心してペレットを得た。これに先に得られている組み換えプラスミド混合物を加えおだやかに搅拌しプロトプラストを均一に分散させた。これに 20 μl ポリエチレングリコール 1540 を含む P 培地 0.5 ml を加え 1 分間静置した後、更に 4 ml の P 培地を加えた。この形質転換操作はすべて 0℃ で行なわれた。形質転換後、遠心してプロトプラストペレットを得た。これに 5 μl の P 培地を加え十分搅拌・洗浄し遠心した。この操作は少なくとも 3 回行ない所定量の P 培地に形質転換液のプロトプラストを懸濁し再生培地 (R₂MP 寒天平板) 上に塗抹した。

の中でメラニンを产生しない株 (Mel⁻ 株) が組み換えプラスミドを持つてある形質転換株であるので、 Mel⁻ 株を選別した。

実施例 2 ML-238B-N_a の 8 位を水酸化し CG-514 へ変換する能力を有する形質転換株のスクリーニング

一次スクリーニングは次の通り実施した。即ち、 Mel⁻ を示す選別された形質転換株を最終濃度 300 μg/ml の ML-238B-N_a を添加した G PY 寒天平板 (2% グルコース、 1% ポリベブトン、 0.1% 酵母エキス、 2% 寒天、 pH 7.0) に移植し、 28℃ で 7~10 日間培養しコロニーを十分生育させた。これらのコロニーをトロツカーデ打抜き、直徑 1.5 cm の寒天ブラングを作製した。このようにして各々のコロニーを打抜き作製した寒天ブラング 10 個を 1 つの集団として 1.5 ml 容マイクロチューブに入れ、 20 μl エタノール 2000 μl を加えよく搅拌、抽出した。次いで 15,000 rpm で 5 分間遠心分離した上清を HPLC にかけ、 CG-514 に由来するピーク

の存在の有無を判別し一次スクリーニングとした。HPLC はカラムとしてラジアルパック C₁₈ を用い移動相として 2 % アセトニトリルおよび 0.1 % トリエチルアミン (pH 3.2; リン酸によって調製した) の混合溶剤を用い、流速は 2 ml / 分で行なつた。

二次スクリーニングは、一次スクリーニングで CS-5114 に由来するピークの存在が認められた集団に含まれる 10 個のコロニーから失々をテオペプチド 2.5 μg/ml を含有する QPY 液体培地に接種し 28 ℃ で 3 日間振盪培養した。次いで ML-238B Na を 300 μg/ml 濃度になるよう添加し、さらに 28 ℃ で 2 ~ 3 日間振盪培養を継続した。該培養液を 1.0 ml 容マイクロチューブに採取し、15,000 rpm で 5 分間遠心分離して上清を採取し HPLC にかけ、ML-238B Na の 8 β 位を水酸化し CS-5114 へ変換しているクローンを選別した。HPLC の条件は一次スクリーニングと同じであるが状況に応じて移動相を 3 % アセトニトリルおよび 0.1 % トリ

即ち、34 % 蔗糖を含有する QPQ 培地 2.0 ml を 5.0 ml 容瓶つきフラスコに入れ、これに MLR-1528 No. 418 株の菌糸体を接種後、24 ~ 28 ℃ で約 1.2 時間、120 rpm の往復振盪板上で培養した。次いで 5.0 ml 容瓶口フラスコに入つた、34 % 蔗糖を含有する QPQ 培地 1.0 ml に上記種培養の懸濁液を培地の 1 ~ 5 % 相当量を接種し、24 ~ 28 ℃ で 24 ~ 48 時間往復振盪板上で培養した。

この培養液から低速遠心 (例えば 10,000 g, 4 ℃, 20 分) で菌糸体を集めし、上澄液を傾斜で除いて菌糸体ペレットを得た。菌糸体ペレットを 2.0 ml の TES 緩衝液 (25 mM トリスヒドロキシメチル アミノメタン (トリス), 25 mM EDTA および 2.5 mM 食塩, pH 7.5) に再懸濁し、次いでこの再懸濁物に 1.0 mg/ml の強度のリゾチーム溶液を 1 ml 加え、この混合物を 37 ℃ で 5 ~ 15 分強く搅拌しながら加温し、次にこれに 1 ml の 1.0 % ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液を加え、よく混合したのち 37

エチルアミン (pH 3.2; リン酸によって調製した) の混合溶剤、流速を 1 ml / 分に変えて行なつた。

実施例 1 ML-238B Na の 8 β 位を水酸化し CS-5114 へ変換する能力を有する形質転換株ストレプトミセス・リビダンス MLR-1528
No. 418 株の培養とプラスミド pHY01 の調製
およびストレプトミセス・リビダンスの再形質転換

実施例 2 に記載されたスクリーニング方法によつて、ML-238B Na の 8 β 位を水酸化し、CS-5114 へ変換する能力を付与された形質転換株ストレプトミセス・リビダンス MLR-1528 No. 418 株が選択された。これは、この株が特定のプラスミド (プラスミド pHY01) を含有しているために ML-238B Na を CS-5114 へ変換できるようになつたものと考えられる。このプラスミド pHY01 を調製し、ストレプトミセス・リビダンスを再形質転換してその確認を行なつた。

てで 8 分間加温して溶解した。

次いでこの溶解物を 40,000 g, 4 ℃, 30 分遠心することで粗製溶解物を上澄として得、これに 1/4 容量の 5 M 食塩を加えて最終食塩濃度を 1 M とし、0 ℃ で 2 ~ 3 時間冷却すると先に加えた SDS が沈澱してくるので、30,000 g, 0 ℃, 1.5 分の遠心を行ない、SDS を除いた。この上澄液にリボヌクレアーゼを加えて 37 ℃ で 20 分更にプロナーゼを加えて 37 ℃ で 20 分消化を行なつた。この消化液に 4.0 % ポリエチレンギリコール (PEG) 8000 溶液を最終濃度 1.0 % になるよう添加し、この混合物を 0 ℃ で 1 晩保つと、DNA が沈殿してくるので、緩い遠心 (30,000 g, 0 ℃, 1.5 分) 後上澄を捨て、沈澱物を 4.7 ml の TES 緩衝液に懸濁して十分に溶かし、TES 緩衝液中で透析し、DNA 抽出サンプルを得た。

このようにして得た DNA 抽出サンプルに塩化セシウムを混含し、更に蛍光発色剤エチジウム・ブロミド (EtBr) を加え、混合して L620

の密度の溶液を調整した。この溶液は 150,000 \times G、18°Cで40時間平衡密度勾配遠心を行ない、この遠心管に320nmの紫外線を照射すると、遠心管内で染色体由来の環状DNAの強い蛍光帯の下に、閉環状のプラスミドpHYO1のDNAが蛍光帯として分離しているのが見いたせた。

閉環状のプラスミドDNAの蛍光帯部分を採取し、これを等量のローブチルアルコールで2回抽出してエチジウム・ブロミドを除去し、次に水層を適当な緩衝液(例えば、10mMトリス、10mM食塩および1mM EDTA, pH=7.0)で透析して純粋な組み換えプラスミドpHYO1を得た。

このようにして得られた純粋な組み換えプラスミドpHYO1は紫外線280nmの吸光度から濃度が求められた。

組み換えプラスミドpHYO1における挿入DNA断片の大きさはアガロース・ゲル電気泳動によって算出された。即ち、組み換えプラスミド418P-7を制限酵素Bcl Iで切断することによりベクタープラスミドpMEL18に挿入されている

からのプラスミドpHYO1の除去とpHYO1による形質転換

プラスミドpHYO1が導入されたことによつてML-238BNaをCB-514へ変換する能力が付与された形質転換株MLR-1528 No. 418からアクリフラビンまたはプロトプラスト再生によつてプラスミドpHYO1が脱落、除去された418P-7株を取得した。この株はプラスミドpHYO1の除去に伴つてチオペプチンに感受性であつた。また、この株は実施例2に記載された二次スクリーニングと同じ方法によつてCB-514への変換能の有無を調べたところ、変換活性は認められなかつた。さらにこの株について先に述べた無細胞抽出液を用いてCO基スペクトルを測定したところ450nm付近の極大吸収が消失していた。一方、対照株のプラスミドpHYO1を保持したMLR-1528 No. 418株においては変換活性およびCO基スペクトルにおける450nm付近の極大吸収が認められた。

次いでプラスミドpHYO1を用いてこのプラス

DNA断片の大きさが判別出来る。挿入DNA断片の大きさは約10kbであることが判明した。分子量マークーとしてラムダDNAのHind III切断片または λ 174 DNAのBae I切断片を用い、電気泳動の移動度からBcl I消化によつて生成する5つのDNA断片の大きさを測定した。これらの総和(約158kb)とベクタープラスミドpMEL18の大きさ(約88kb)との差を挿入DNA断片の大きさとした。

なお、このようにして得られた組み換えプラスミドpHYO1(第2図参照)を用いて実施例1に記載した方法でストレプトミセス・リビダンス SANK83086(横研菌番号8168号)を再形質転換した。この再形質転換によつて得られた形質転換株50株についてML-238BNaのCB-514への変換能について検討したところ、すべての株で変換能が認められた。またこれらの株から分離されたプラスミドはpHYO1であつた。

実施例4 形質転換株MLR-1528 No.418

ミド除去株418P-7を実施例1に記載した方法で形質転換した。この形質転換で得られた形質転換株はチオペプチンに耐性となつておらず、また実施例2に記載された二次スクリーニングと同じ方法によつてCB-514への変換活性を調べたところ変換活性は復帰していた。さらにCO基スペクトルを測定したところ450nm付近の極大吸収もまた復帰していた。このことはML-238BNaの4P位を水酸化しCB-514へ変換する変換酵素、即ち水酸化酵素はチトクロームP-450である可能性を示し、かつこのチトクロームP-450遺伝子はプラスミドpHYO1の挿入DNA断片中に存在していることを示すものである。

実施例5 プラスミドpHYO2を単独に含む形質転換株の造成とML-238BNaからCB-514への形質転換能

実施例3に記載したようにプラスミドpHYO1によつて再形質転換して得られた形質転換株50株にはすべてプラスミドpHYO1が存在して

いることが確認されたが、これらのうちの1株がプラスミドpHYO1を含むほぼ同じ大きさの2種類のプラスミドを含有しているプラスミドの混合物であることがSac Iの消化によって生成するDNA断片の解析から判明した。

即ち、pHYO1はSac I消化によつて約10 kbおよび約8.8 kbのDNA断片を生成するが、該混合物はSac I消化によつてプラスミドpHYO1に由来する約10 kbと約8.8 kbのDNA断片以外にpHYO2と命名したプラスミドに由来する約13.1 kbと約24 kbのDNA断片を生成していた。そこでプラスミドpHYO2を分離するために該混合物を用いて実施例1に記載した方法によつて形質転換を実施し、生育した形質転換株から実施例3に記載した方法でプラスミドを調製した。次いで該プラスミドをSac Iで消化することによつて約13.1 kbと約24 kbのDNA断片を生ずるものを選択して、プラスミドpHYO2を単独に含む形質転換株が得られた。プラスミドpHYO2を単独に含む形質転換株のML-236B

ていることを示している。このことは、プラスミドpHYO2のSac I消化によつて生ずる24 kbのDNA断片は水酸化酵素活性の発現には不要であることを示す。従つてこの24 kbのDNA断片を除去することが可能である。この24 kb DNA断片を除去した小型化プラスミドpHYO2の調製は以下の通りに行なわれた。

プラスミドpHYO2の1 μgを5uのSac Iを用いて37℃で2時間消化した。次いで70℃にて10分間加熱しSac Iを失活させた後、エタノール沈殿を行なつた。次いでこのSac I消化エタノール沈殿物を乾燥後、35 μlの蒸留水に溶解し、これに10倍濃度のリガーゼ反応用緩衝液5 μl、50 mMジチオスリトール5 μlおよび10 mM ATP 5 μlを加え全量を50 μlとした。これにT4 DNAリガーゼ2uを加え、14℃で16時間反応させた。このようにしてプラスミドpHYO2のSac I消化DNA断片をセルフライゲーションし、これを実施例3に記載したプラスミドpHYO1の除去株(416P-1株)

NaからCS-514への形質転換能は実施例2に記載した二次スクリーニングの方法によつて測定し、形質転換能を保持していることを確認した。

実施例6 プラスミドpHYO2の調製

プラスミドpHYO2はその制限酵素切断地図から、水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子を含む約10 kbの挿入DNA断片において宿主菌体内において少なくともSac IからSph Iサイトまでの約6.7 kbを含む約7.1 kbのDNA断片が組み換えをうけプラスミドpHYO1の挿入DNA断片における当該部分との相同域が逆向きに配位されたものであつた(第3図参照)。このように少なくともSac IからSph Iサイトまでの約6.7 kbを含む約7.1 kbのDNA断片が逆向きに配位されたにも拘わらずML-236BNaがCS-514への変換を受けたことは、ML-236BNaをCS-514へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子がこの約21 kbのDNA断片内に位置し

のプロトプラストへ実施例1に記載した方法によつて導入し、Thio^rを示す形質転換株を得た。次いでこれらの形質転換株から実施例3に記載された方法によつてプラスミドを抽出し約2.4 kb DNA断片を失ったプラスミド、即ち約13.1 kbの大きさを有するプラスミドを選択した。このようにして得られたプラスミドはSac I切断部位を1ヶ所持つ約13.1 kbのプラスミドpHYO2の(第4図参照)である。このプラスミドはpHYO2と同じようML-236BNaの6位を水酸化しCS-514へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450遺伝子を有する。少なくともSac IからSph Iサイトまでの約6.7 kb部分を含む約7.1 kbのDNA断片を持っており、プラスミドpHYO1およびpHYO2と同じく宿主細胞にML-236BNaからCS-514へ変換する能力を付与する。

実施例7 プラスミドpHYO2の調製

プラスミドpHYO2の5 μgを15uのSph Iを用いて37℃で2時間消化した。次いで70℃にて

1.0分間加熱しSph Iを失活させた後、0.8%アガロース・ゲル電気泳動にかけた。アガロース・ゲル電気泳動では約11.6 kbと約1.5 kbのDNA断片が生成しており、このうち約11.6 kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気溶出法によって該DNA断片を溶出した。溶出液35μlに10倍濃度のリガーゼ反応用緩衝液5μl、5.0mMジテオストリートール5μl、および1.0mM ATP 5μlを加え全量を50μlとし、これにT₄DNAリガーゼ2^Uを加え14℃で16時間反応させた。このようにしてプラスミドpHYO 21のSph I消化によって生ずる約11.6 kbのDNA断片をセルフライゲーションし、これを実施例3に記載した416P-7株のプロトプラストへ実施例1に記載した方法によって導入し、Thio^rを示す形質転換株を得た。次いでこの形質転換株から実施例3に記載された方法によってプラスミドを抽出した。このようにして得られたプラスミドはSph I切断部位を1ヶ所持つ約11.6 kbのプラスミドpHYO 22(第5図参照)である。このプラスミドはpHYO 21の持つ約7.1 kbの挿入

DNA断片からSph I消化によって生成する約1.5 kbが除かれた約5.6 kbの挿入DNA断片を持っているが、宿主細胞(416P-7株)にML-236B NaからCS-514へ変換する能力を付与し得ない。

実施例8. プラスミドpHYO 23の調製

プラスミドpHYO 21の5μgを15^UのMlu Iを用いて37℃で2時間消化した。次いで70℃に1.0分間加熱しMlu Iを失活させた後、0.8%アガロース・ゲル電気泳動にかけた。アガロース・ゲル電気泳動では約8.6 kb、約3.6 kb(ベクターDNA断片の約0.3 kbを含む)および約0.9 kbのDNA断片が生成しており、このうち約8.6 kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、電気溶出法によって該DNA断片を溶出した。この溶出液3.5μlに10倍濃度のリガーゼ反応用緩衝液5μl、5.0mMジテオストリートール5μlおよび1.0mM ATP 5μlを加え全量を50μlとしこれにT₄DNAリガーゼ2^Uを加え14℃で16時間反応させた。このようにしてプラスミドpHYO 21のMlu I消化によって生ずる約8.6 kbのDNA断片をセルフライゲーション

し、これを実施例3に記載した416P-7株のプロトプラストへ実施例1に記載された方法によって導入しThio^rを示す形質転換株を得た。次いでこの形質転換株から実施例3に記載された方法によってプラスミドを抽出した。このようにして得られたプラスミドはMlu I部位を1ヶ所持つ約8.6 kbのプラスミドpHYO 23(第6図参照)である。このプラスミドはpHYO 21の持つ約7.1 kbの挿入DNA断片からMlu I消化によって生成する約0.9 kbおよびベクターDNA断片の約0.3 kbを含む約3.6 kbが除かれた約2.9 kbの挿入DNA断片を持ち、宿主細胞(416P-7株)にML-236B NaからCS-514へ変換する能力を付与する。しかしその能力はpHYO 21によって付与される能力に比べると約1/3程度である。

試験例1.

(1) ストレプトミセス・リビダンス SANK 63086 への ML-236B Na を CS-514 へ変

換する能力の付与

それぞれ次の菌株

- (a) ストレプトミセス・リビダンス SANK 63084(微工研菌寄第8188号);
- (b) ベクタープラスミドpMEL18を含むストレプトミセス・リビダンス SANK 63086であるストレプトミセス・リビダンス SANK 60587(微工研菌寄第8188号);
- (c) ストレプトミセス・リビダンス SANK 63088株の本発明によるML-236B NaをCS-514へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450還元子を含むDNAを含有する組み換えプラスミドpHYO1による形質転換株であるMLR-1528-N0418株;
- (d) MLR-1528-N0418株からプラスミドpHYO1を除去した株である416P-7株;
- (e) 416P-7株のプラスミドpHYO1による再形質転換株であるRTY-45株;
- (f) 416P-7株のプラスミドpHYO 21によ

る再形質転換株であるRTF-182株；これらのうち(a)のストレプトミセス・リビダンスSANK83086株と(d)の418P-7株はOPY培地に接種し、(b)のストレプトミセス・リビダンスSANK80587株、(c)のMLR-1528No.418株、(e)のRTF-85株および(f)のRTF-182株はテオペプチン $2.5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ を含むOPY培地に接種し、28℃で3日間振盪培養した。次いで、これを種として新鮮なOPY培地にこれを5多量接種した。次いで、28℃で1日振盪培養した培養液にML-236BNaを500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度になるように添加し更に28℃で3日間振盪培養した。次いで1.5ml容マイクロチューブに各培養液を採取し15,000rpaで1分間遠心分離した後、上清を採取しHPLCによって生成したCS-514を測定した。

CS-514の生成量は(a)は $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、(b)は $5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、(c)は $3.5\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、(d)は 1

と「チトクロームP-450の測定」のための無細胞抽出液の調製法は次のように行なつた。OPY培地で前培養した菌株を新鮮なOPY培地100 ml (800ml容三角フラスコに入つたもの)に5多量接種し28℃で24時間回転振盪培養した。

ML-236BNaを500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう添加し、さらに28℃で24時間回転振盪培養を継続した。培養液を0℃で4000×gにて15分間遠心分離して集菌した。水中で冷却した0.85%食塩水で3回洗浄後、湿菌体重量の倍量の冷20%G(7/V)グリセロール、2mMジオースリトルを含む1.0mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.4、以下「△緩衝液」という)を加え、氷冷下超音波破碎した。次いで20,000×gで30分間遠心分離し、上清を採取し無細胞抽出液とした。

ML-236BNaからCS-514への水酸化酵素活性測定法は各株の無細胞抽出液を次の条件(反応液組成)

$49/\text{ml}$ 、(b)は $340\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 、(c)は $380\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ であつた。このことはプラスミドpHYO1およびプラスミドpHYO21が本来ML-236BNaの1位を水酸化しCS-514へ変換する能力を持たないか、もしくは極めて低い能力しか持たない宿主、ストレプトミセス・リビダンスSANK83086株にML-236BNaからCS-514へ変換する能力を付与していることを示すものである。

試験例2 プラスミドpHYO1及びプラスミドpHYO21保持株の水酸化酵素活性測定とチトクロームP-450の測定

プラスミドpHYO1及びプラスミドpHYO21によるストレプトミセス・リビダンスの形質転換株(MLR1528No.418、RTF-85およびRTF-182)対照株としてストレプトミセス・リビダンスSANK83086およびストレプトミセス・リビダンスSANK80587等の「ML-236BNaをCS-514へ変換する水酸化酵素活性の測定」

無細胞抽出液	0.8 ml
NADPH再生系	
NADP	0.28 ml
グルコース-6-リン酸	1.4 mM
グルコース-6-リン酸脱水素酶	0.5 u
ニコチン酸アミド	1.0 mM
塩化マグネシウム	2.5 mM
フェレドキシン・NADP+-還元酵素	0.025 u (ホウレン草)
フェレドキシン(クロストリジウム...)	5 μg (バストイリアヌム)
ホフアチジルコリン	2 nM
硫酸第1鉄	1 mM
ML-236BNa(基質)	2.33 mM
最終容量	1 ml

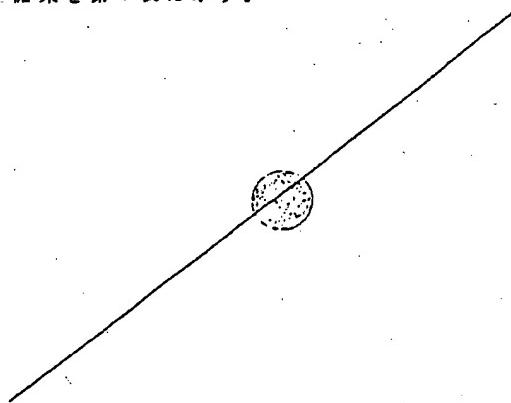
で30℃1時間振盪しながら反応させた。次いで6N-NaOH 50 μl を添加しpHを調整したのち、HPLC(カラム: ウオターズラジアルパックカラートリツジC18、溶出条件: 27%アセトニトリル/ $4.1\text{ M H}_3\text{PO}_4$ 、TEA(pH3.2))

王利定下、酵素活性測定液1ml/瓶に1mg/ml CS-514にて生成したCS-514が1μg/ml生成する場合を1ユニットと定めた。

チトクロームP-450はOmuraらの方法(*J.Biol.Chem.*, 238, 2370, (1964))に従い還元型Co差スペクトルにより同定した。またチトクロームP-450は下式に従つて定量した。

$$\text{チトクロームP-450 (nmol/ml)} = \\ (0.4450 - 0.4400) \times 1000 / 81$$

結果を第1表に示す。



第1表より、ML-238BNaのCS-514への変換酵素活性は宿主(ストレプトミセス・リビダンスSANK62086)及びベクタープラスマドによる形質転換株(ストレプトミセス・リビダンスSANK60587)では検出されないが、プラスマドpHYO1による形質転換株では変換酵素活性が出現し、同時にチトクロームP-450の産生も認められる。プラスマド除去株では変換酵素活性と共にチトクロームP-450の産生は認められなくなり、該菌株をプラスマドpHYO1またはプラスマドpHYO21によつて形質転換することによつて変換酵素活性が再び出現し、同時にチトクロームP-450も産生されるようになる。

挿入方向の異なるDNA断片を有するプラスマドpHYO1, pHYO21がともに、本来ML-238BNaをCS-514へ変換する能力を持たないか、または持つても極めて低い能力の宿主であるストレプトミセス・リビダンスSANK62086またはストレプトミセス・リビダンス

菌体	プラスマド	蛋白 ug/ml	チトクロームP-450 nmol/ml(416nm)	
			変換酵素活性 u/ml	チトクロームP-450 nmol/ml(416nm)
SANK62086	None	1.2.3	ND	ND(ND)
ストレプトミセス・リビダンス SANK62086	None	1.2.3	ND	ND(ND)
ストレプトミセス・リビダンス SANK60587 (ベクター)	None	1.2.3	ND	ND(ND)
ML-238 No.416	pHYO1	1.4.0	4.00	1.495(416nm)
416P-7(プラスミド除去)	None	2.0	ND	ND(ND)
RTF-258	pHYO1	2.3	0.54	0.501(4068)
RTF-286	pHYO21	6.6	5.34	0.413(6012)
RTF-288	-	-	-	-

416P-7IC、該変換能と同時にチトクロームP-450の產生能をも付与することは、これらの組み換えDNAに含有される挿入DNA断片に水酸化酵素活性を有するP-450遺伝子がプロモーター領域を持ってクローン化されたことを示す。

試験例3 ナトクロームP-450遺伝子の局在領域の検討

プラスマドpHYO21, pHYO22及びpHYO23によるストレプトミセス・リビダンス416P-7の形質転換株(RTF-258, RTF-286及びRTF-288)、対照株としてストレプトミセス・リビダンスSANK60587等の「ML-238BNaをCS-514へ変換する水酸化酵素活性の測定」と「チトクロームP-450の測定」のための無細胞抽出液の調製法、「ML-238BNaをCS-514へ変換する水酸化酵素活性の測定」および「チトクロームP-450の測定」は試験例2に従つて行なった。

第7図よりチトクロームP-450生産には少くともSphI消化によって生じる約1.5kbのSphI断片を含むBgII/MboIのベクターと挿入DNA断片

注1) 蛋白濃度はLowry法(*J.Biol.Chem.*, 193, 205, (1951))により、牛血清アルブミンを基準として測定した。

2) ND: 検出されず

の連結部位から Mlu I 切断部位までの約 2.9 kb の DNA 断片が必要であることが示される。即ちテトクローム P-450 遺伝子はプラスミド pHYO 23 の挿入 DNA 断片と Bgl II/ Mbo I の連結部位から Mlu I 切断部位までの約 2.9 kb が存在していることになる。しかしながら宿主に ML-236BN_a から CS-514 への十分な変換活性を付与するために pHYO 21 の持つ挿入 DNA 断片約 7.1 kb が必要であると考えられる。

参考例 プラスミド pMEL 18 の構築と調製方法

プラスミド PIJ 702 (Katz et al., J. Gen.

Microbiol., 129, 2703 (1983)) 上に存在するチロシナーゼ遺伝子 (*mel gene*) はすべてのストレプトミセスで発現されるものではない。そこで該 *mel gene* を発現し得ないストレプトミセスにおいてもメラニン産生を指標としてクローニング出来るよう設計されたプラスミド pMEL 18 を構築した。PIJ 702 の *mel gene* を発現し得ない宿主ストレプトミセスとしてストレプトミセス・ジーモンジネンシス [16]-8-SANK 61185 (以下、

[16]-8-SANK 61185 株) (微生物研究会第 1140 号 (FERM BP-1140)) を用いた。PIJ 702 の *mel gene* を発現し得な

い宿主 [16]-8-SANK 61185 株) に、該 *mel gene* を発現させ得る能力を付与する DNA 断片は全てのストレプトミセスの染色体 DNA から分離することが可能であるが、ここではストレプトミセス・エス・ピー-SANK 61184 の培養菌糸体から Marmur 法 (J. Mol. Biol., 3, 208 (1961)) によって抽出した DNA を外因性 DNA として供試した。

ストレプトミセス・エス・ピー-SANK 61184 の DNA 5 μg とプラスミド PIJ 702 の 1 μg を混合し、次いで 4 倍濃度の制限酵素反応液 1/3 容量および制限酵素 Sph I 1U を加えた。DNA を完全に切断するため 37°C で 2 時間培養した後、70°C で 10 分間加熱し制限酵素を失活させた。この試料に 1/10 容量の 3 M 酢酸ナトリウムを加え攪拌し、次いで 2.5 倍量の -20°C で冷却したエタノールを加えた後、-70°C で 10 ~ 20 分間冷却した。この試料を微量遠心機にて遠心し上清を捨て DNA 沈殿を -20°C のエタノールで洗浄した。次いで真空中で乾

燥し滅菌蒸留水にて溶解後、10 倍濃度に調製したりガーゼ反応液 (600 mM トリス・HCl, 60 mM MgCl₂ · H₂O, 100 mM DTT, 1.1 mM ATP, pH 7.8) を 1/8 容量加えた。さらにこれに T4 DNA リガーゼを加え、14°C で 1.6 時間インキュベート後、85°C で 10 分間加熱しリガーゼを失活させた。これを形質転換用試料として用いた。該形質転換用試料を用いての [16]-8-SANK 61185 株の形質転換は次の通りに行なつた。即ち、50 ml 容瓶つきフラスコに GGCY 培地 20 ml を入れこれに [16]-8-SANK 61185 株の菌糸体を接種後、24 ~ 28°C で 7 ~ 2 時間、120 rpm の往復振盪機上で培養した。これを種とし GGCY 培地 100 ml が入つた 800 ml 容瓶口フラスコに 5 倍量接種し 24 ~ 28°C で 24 時間往復振盪機上で培養した。この培養液から低速遠心で菌糸体のペレットを得、これを 20 ml の P 培地 (320 mM 蘆糖, 25 mM TES 缶衝液, 70 mM 食塩, 10 mM MgCl₂, 20 mM CaCl₂) に懸濁し洗浄後、遠心し得られた菌

体ペレットを再び20mlの△培地に懸濁した。この菌体懸濁液に40mg/ml濃度のリゾチーム溶液を1ml加え、28℃で1時間加温して[18]-8・SANK 61185株のプロトプラストが生成した。プロトプラストと未溶解の菌糸体の混合物は、これをグラスフィルター(303)にて自然ろ過しプロトプラストを多量に含有したプロトプラスト液を得、これを低速遠心しペレットを再び△培地に懸濁した。この操作を3回繰返し十分洗浄することにより所望のプロトプラスト液を含有するプロトプラスト液を調製した。

形質転換は、先に調製した形質転換用試料を用いて、実施例1に記載した方法によつて行なつた。形質転換操作を終了したプロトプラストを適宜懸濁しR₂MP再生培地(培地組成は実施例1に記載)上に塗抹した。R₂MP寒天平板上に塗抹後、28℃で20時間培養したR₂MP寒天平板上に最経濃度50μg/mlとなるようチオベプチジンを加えた軟寒天R₃培地(培地組成は実施例1に記載)を3ml重層した。重層後、

た。

培地組成がグルコース0.4%, 父芽エキス1.0%及び酵母エキス0.4%であつてチオベプチジンを25μg/mlになるよう添加した培地20mlを50ml容瓶つきフラスコに入れ、これにMEL18株の菌糸体を接種後、24~28℃で約7.2時間120rpmの往復振盪機上で培養した。次に菌糸体回収用培地組成がグリセロール0.4%, カザミノ酸0.4%, 酵母エキス0.05%, 父芽エキス0.1%, MgSO₄ 0.1%, CaCl₂·2H₂O 0.01%, KH₂PO₄ 0.2%及びNa₂HPO₄·12H₂O 0.8%(PEL2に調整)であつて、チオベプチジンを25μg/mlになるよう添加した培地100mlを500ml容坂口フラスコに入れこれに上記種培養の懸濁液を培地の1~5倍相当量を接種し、24~28℃で24~48時間往復振盪機上で培養した。

この培養液から低速遠心(例えば10,000×g, 4℃, 20分)で菌糸体を採取し、上澄液を傾斜瓶で除いて菌糸体ペレットを得た。プラスミド

寒天平板を28℃で培養を継続するとチオベプチジンに耐性を示す300の形質転換株の生育がみられた。その中でメラニン色素を産生する株が7株認められた。これらの株から分離したプラスミドは130から1640ベース・ペア(bp)のDNA断片を保持しており、それぞれpMEL18からpMEL24までに命名された。なおこれらのプラスミドpMEL18からpMEL24までが宿主の[18]-8・SANK 61185株にメラニン色素産生を付与することは再形質転換によつて確認された。

これらの7つのプラスミドのうちpMEL18は130 bpのDNA断片をもち、且つこの130 bpの断片中にはBgl IもしくはSac Iの制限酵素認識部位が認められないことから、この部位を用いたクローニングベクターとして、PIJ 102を用いることの出来ない宿主にも使用出来る。純粋なプラスミドpMEL18の抽出、宿主のための培養は、pMEL18を保持する形質転換体(MEL18株)を用いて以下の通り行なわれ

pMEL18の抽出精製は、該菌糸体ペレットを再懸濁したものより実施例3に記載した方法に基づいて行ない純粋なプラスミドpMEL18を得た。

組み換えプラスミドにおける挿入DNA断片の大きさはアガロース・ゲル電気泳動によつて算出された。即ち、組み換えプラスミド0.8μgを制限酵素Sph Iで切断することにより、ベクタープラスミドとして用いたPIJ 102の線状化した0.8キロベースの断片と130 bpの挿入DNA断片の2本のバンドが生成した。分子量マーカーとしてラムダDNAのHind III切断断片またはEco RI DNAのEco III切断断片を用い、挿入DNA断片の大きさによつてアガロース・ゲルの濃度を0.8%, 1.2%, 2%と変えて電気泳動し分子量マーカーの移動度から挿入DNA断片の大きさを測定した。

このようにして得られたプラスミドpMEL18はストレプトミセス・リビダンスSANK 63086に導入し、ストレプトミセス・リビダンスSANK 80587として寄託されている(微生物菌種第

8188号)。

4. 図面の簡単な説明

第1図はML-238B Naの8'位を水酸化しCS-514へ変換する水酸化酵素活性を有するチトクロームP-450の遺伝子を含有する約2.1kbのDNA断片の制限酵素切断地図である。

図中、SaはSac I, KはKpn I, PはPst I, MはMlu I, SpはSph I, XはXba I, EはEcoR IおよびBcはBcl Iによる切断点を示す。数字は各制限酵素切断位置間の距離を示すkbで表わしている。

第2図は組み換えプラスミドpHYO1の制限酵素切断地図である。数字はベクタープラスミド(細線で表わされている)として用いたpMEL18に存在するBamHI切断点を座標点とした場合の各制限酵素切断位置を表わしている。斜線部分はプラスミドpHYO2およびプラスミドpHYO21の挿入DNA断片との相同領域を表わしている。

第3図は組み換えプラスミドpHYO2の制限酵

DNA断片を除去したものである。

第6図は組み換えプラスミドpHYO23の制限酵素切断地図である。数字はベクタープラスミド(細線で表わされている)に由来するDNA断片上のBamHI切断点を座標点とした場合の各制限酵素の切断位置を表わしている。本プラスミドはプラスミドpHYO21のMluI消化で生じる約3.6kbと約0.9kbのDNA断片を除去したものである。

第7図はプラスミドpHYO21の持つ挿入DNA断片約7.1kbにおけるチトクロームP-450遺伝子の局在部位の検討結果を示したものである。各プラスミドによって形質転換された宿主、ストレプトマイセス・リビメンスにおける変換酵素活性とチトクロームP-450産生との関係が示されている。図中、黒線はベクターデNA断片、白線は挿入DNA断片を表わし、点線は除去されたDNA断片の領域を表わしている。

特許出願人 三共株式会社
代理人弁理士 横出庄治

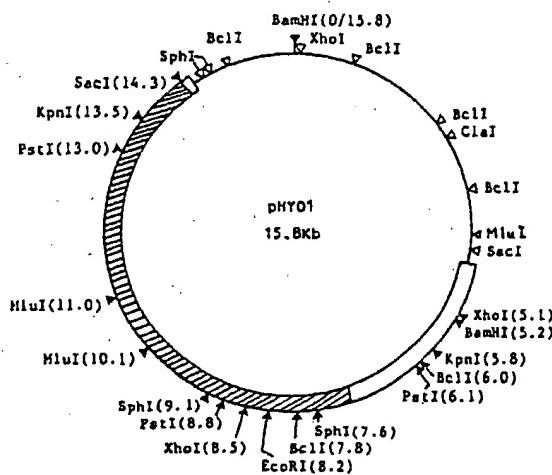
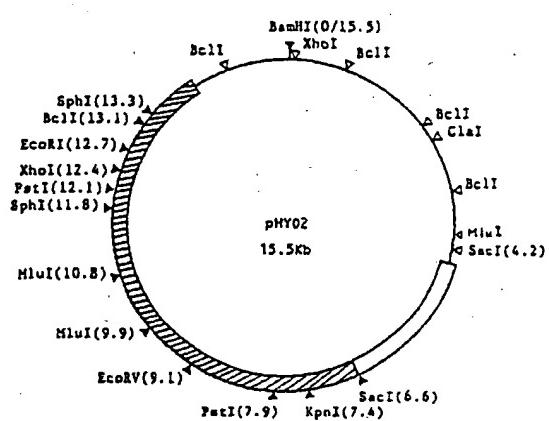
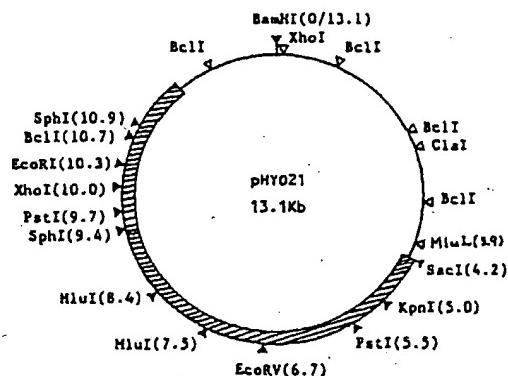
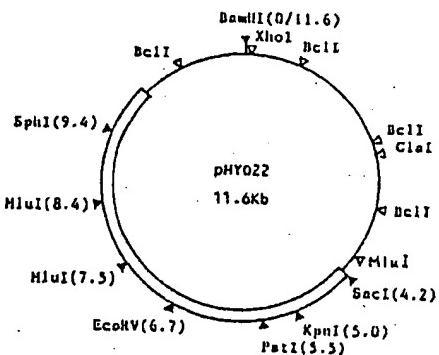
第8図はベクタープラスミド(細線で表わされている)に由来するDNA断片上のBamHI切断点を座標点とした場合の各制限酵素の切断位置を表わしている。斜線部分はプラスミドpHYO1の挿入DNA断片との相同領域を表わしている。

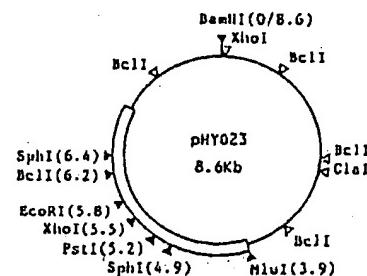
第4図は組み換えプラスミドpHYO21の制限酵素切断地図である。数字はベクタープラスミド(細線で表わされている)に由来するDNA断片上のBamHI切断点を座標点とした場合の各制限酵素の切断位置を表わしている。本プラスミドはプラスミドpHYO2のSacI消化で生じる約2.4kbのDNA断片を除去したものである。斜線部分はプラスミドpHYO2の斜線部分と同一である。

第5図は組み換えプラスミドpHYO22の制限酵素切断地図である。数字はベクタープラスミド(細線で表わされている)に由来するDNA断片上のBamHI切断点を座標点とした場合の各制限酵素の切断位置を表わしている。本プラスミドはプラスミドpHYO21のSphI消化で生じる約1.5kbの

第1

(BgII/MboI)	Sp	Bc	E	X	P	Sph	M	M	P	K	Sa
0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	1.0	0.9			3.0	0.8	0.8
0.7											

第 2 第 3 第 4 第 5 

第6 第7

ナフロ-4 P-450 遺伝子の局在部位の検討

	宿主の選択 酵素活性 (U/mg 蛋白)										ナフロ-4 P-450	
	(nmol/mg 蛋白)											
pHY021 (RTF-258)	0.4	0.4	0.3	0.3	0.3	0.8	0.8	2.0	0.8	0.8	67.37	0.239
pHY022 (RTF-286)											ND	ND
pHY023 (RTF-288)											41.88	1.238
pMEL18 (416P-7)											ND	ND